



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0098616
(43) 공개일자 2020년08월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) *A61K 31/122* (2006.01)
A61K 31/191 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) *A61K 47/14* (2017.01)
A61K 47/22 (2017.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A61K 31/122 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7020094
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월26일
 심사청구일자 2020년07월10일
- (85) 번역문제출일자 2020년07월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/067480
- (87) 국제공개번호 WO 2019/133588
 국제공개일자 2019년07월04일
- (30) 우선권주장
 62/610,565 2017년12월27일 미국(US)

- (71) 출원인
새미 랩스 리미티드
 인도 카르나타카 방갈로-560058 피냐 인터스트리얼
 얼 에리어 페이스 2 메인 1 19/1 앤드 19/2
- (72) 발명자
마지드, 무하메드
 미국 뉴저지 08520 이스트 원저 레이크 드라이브
 20 사빈사 코포레이션
나가브후스하남, 칼야남
 미국 뉴저지 08520 이스트 원저 레이크 드라이브
 20 사빈사 코포레이션
문드쿠르, 락슈미
 인도 560058 방갈로르 피냐 인터스트리얼 에리어
 II 페이스 I 메인 19/1 & 19/2 새미 랩스 리미티드
- (74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **고혈당증 및 관련 병태의 관리를 위한 조성물**

(57) 요약

티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물을 이용한 포유동물에서의 고혈당증의 치료학적 관리 방법이 개시되어 있다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효소 α -글루코시다제의 활성을 억제하고 포유동물 세포에 의한 포도당의 세포 포착을 증가시키기 위한 티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물을 개시한다. 또한, 티모하이드로퀴논의 항-산화, 항-염증 및 항-당화 효과도 본원에 개시된다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/191 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/14 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
C12Q 1/34 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

글루코시다제 효소(glucosidase enzyme)를 억제하는 방법으로서, 상기 방법은:

- i) 글루코시다제 효소를 파라니트로페닐- α -d-글루코피라노사이드 기질(paranitrophenyl- α -d-glucopyranoside substrate)과 접촉시키는 단계;
- ii) 최적 조건 하에서 유효 용량의 티모하이드로퀴논(thymohydroquinone) 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물과 인큐베이션(incubation)하는 단계;
- iii) 분광광도법 및 형광측정법을 이용하여 흡광도의 변화를 관측하는 단계;
- iv) 상기 흡광도를 대조군 블랭크(blank)와 비교하고, 하기 식:

$$\text{억제율(\%)} = [(\text{대조군의 흡광도} - \text{억제제의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

을 이용하여 티모하이드로퀴논 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물에 의한 효소 억제율(IC₅₀)을 측정하는 단계를 포함하는, 글루코시다제 효소를 억제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물이 약 0.1% 내지 5% w/w의 티모퀴논(thymoquinone), 약 0.01% 내지 10% w/w의 티모하이드로퀴논, 약 20% 내지 95% w/w의 지방산, 약 0.001% 내지 3% w/w의 α -헤데린(α -hederin) 또는 헤데라게닌(hederagenin), 0.1% 내지 4.0% w/w의 안정화제 및 0.2% 내지 2% w/w의 생체이용률 증강제(bioavailability enhancer)를 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 안정화제는 로즈마린산, 부틸화된 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole), 부틸화된 하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene), 메타중아황산 나트륨(sodium metabisulfite), 갈산 프로필(propyl gallate), 시스테인(cysteine), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 토코페롤(tocopherols)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 생체이용률 증강제는 피페린(piperine), 퀘르세틴(quercetin), 마늘 추출물, 생강 추출물 및 나린진(naringin)을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 5

포유동물 세포에 의한 포도당 포착을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 세포에 의한 포도당 포착을 증가시키기 위해 포유동물 세포를 유효 용량의 티모하이드로퀴논 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물이 약 0.1% 내지 5% w/w의 티모퀴논, 약 0.01% 내지 10% w/w의 티모하이드로퀴논, 약 20% 내지 95% w/w의 지방산, 약 0.001% 내지 3% w/w의 α -헤데린 또는 헤데라게닌, 0.1% 내지 4.0% w/w의

안정화제 및 0.2% 내지 2% w/w의 생체이용률 증강제를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 안정화제는 로즈마린산, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 메타중아황산 나트륨, 갈산 프로필, 시스테인, 아스코르브산 및 토코페롤을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 생체이용률 증강제는 피페린, 퀘르세틴, 마늘 추출물, 생강 추출물 및 나린진을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 사람 세포인, 조성물.

청구항 10

포유동물에서의 고혈당증 및 관련 병태의 치료학적 관리 방법으로서, 상기 방법은 유효 용량의 티모하이드로퀴논 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 혈중 포도당 수준의 감소를 초래하는 것인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 고혈당증 및 관련 병태의 관리가 글루코시다제 효소를 억제하고, 포도당의 세포 포착을 증가시키고, 유리 라디칼을 감소시키고, 염증을 감소시키고, 당화를 감소시킴으로써 포도당의 흡수를 감소시킴에 의해 초래되는, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 고혈당증 관련 병태는 당뇨병, 비만, 고지방단백혈증, 고지혈증, 심혈관 합병증, 암, 죽상 동맥경화증, 신경퇴행성 질환, 알레르기, 염증 및 골다공증을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 질환 상태에서 존재하는, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 조성물이 약 0.1% 내지 5% w/w의 티모퀴논, 약 0.01% 내지 10% w/w의 티모하이드로퀴논, 약 20% 내지 95% w/w의 지방산, 약 0.001% 내지 3% w/w의 α -헤데린 또는 헤데라게닌, 0.1% 내지 4.0% w/w의 안정화제 및 0.2% 내지 2% w/w의 생체이용률 증강제를 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 안정화제는 로즈마린산, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 메타중아황산 나트륨, 갈산 프로필, 시스테인, 아스코르브산 및 토코페롤을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 생체이용률 증강제는 피페린, 퀘르세틴, 마늘 추출물, 생강 추출물 및 나린진을 포함하는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 16

제10항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 사람 세포인, 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적으로/영양보조적으로(nutraceutically) 허용되는 부형제, 보조제(ajuvants), 희석제 또는 담체와 함께 제형화되어 정제, 캡슐, 연질 겔(soft gels), 시럽, 구미(gummies), 분말, 현탁액, 유제(emulsions), 츄어블제(chewables), 캔디(candies) 또는 이터블(eatables)의 형태로 경구 투여되는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 이는 2017년 12월 27일에 제출된 US 가특허 출원 제62610565호의 우선권을 주장하는 PCT 출원이고, 이의 상세는 본원에 참조에 의해 포함된다.

[0003] **본 발명의 배경**

[0004] **본 발명의 분야**

[0005] 본 발명은 포유동물에서의 고혈당증의 치료학적 관리에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 고혈당증 및 이의 관련 병태의 관리시 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물 및 이들의 치료학적 잠재력에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] **종래 기술의 상세**

[0007] 고혈당증은 혈중 포도당 수준이 상승된 상태를 유지하는 병태이다. 만성 고혈당증은 치료를 받지 않은 경우에 당뇨병, 비만, 고지방단백혈증, 고지혈증, 심혈관 합병증, 암, 죽상 동맥경화증, 신경퇴행성 장애, 알레르기, 염증 및 골다공증과 같은 다수의 질환의 발병에 이르는 2차 합병증을 야기할 수 있다. 혈중 증가된 포도당 수준은 반응성 산소/질소종 및 전-염증성 사이토카인의 생산을 증가시켜 산화 스트레스 및 염증을 야기한다. 상승된 포도당 수준은 추가로 단백질 및 기타 생체 분자의 비-효소적 글리코실화(당화)를 증가시켜 세포 노화의 주요 원인인 것으로 보고되어 있는 최종 당화 산물(AGE: Advanced glycation end product)의 생산을 초래한다. AGE는 또한 진행성 악화 및 아포토시스(apoptosis)를 초래하는 세포성 염증 캐스케이드(cascade)를 예시한다.

[0008] 현재 투여되는 약물(예를 들면, 메트포르민)은 혈당 수준을 제어하는데 효과적이다. 이들 합성 약물의 지속적인 섭취는 간 독성 및 신 독성(nephrotoxicity)을 포함하는 다수의 부작용을 야기할 수 있다. 따라서, 보다 안전하고 효과적인 천연 식물 기반 분자가 혈당 수준을 관리하는데 필요하다.

[0009] 고혈당증의 관리에 현재 사용되고 있는 치료 방법은 탄수화물 분해를 조절하는 주요 효소에 대한 억제제를 투여하고 포도당 포착(uptake)을 증가시키는 것을 포함한다. 이러한 측면에서, 글루코시다제(glucosidase) 억제제는 특히 중요하다(Kim et al., Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. Journal of Microbiology, 2013;42:223-227). α -글루코시다제는 글리코겐의 포도당으로의 분해에 필수적이다. 이는 복합 탄수화물 분자에 작용하여 혈류에 쉽게 흡수되는 단당류 단위를 산출한다. α -글루코시다제를 억제하면 혈류로의 포도당 방출이 감소되어 고혈당 병태가 감소된다.

[0010] α -글루코시다제에 대한 다수의 식물 기반 억제제 분자들이 이하 종래 기술 분야에서 논의되고 있다:

- [0011] 1. Thilagam et al., α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of *Senna surattensis*, Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2013; 6(1):24-30
- [0012] 2. Poongunran et al., α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activities of Nine Sri Lankan Antidiabetic Plants, British Journal of Pharmaceutical Research, 2015;7(5): 365-374.
- [0013] 3. Kim et al., Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. Journal of Microbiology, 2013;42:223-227.
- [0014] 그러나, 고혈당증 및 관련 병태의 효과적인 관리를 위해서는 α -글루코시다제를 효과적으로 억제하고 포도당 포착을 증가시키는 식물 기반 분자가 요구된다.
- [0015] 니겔라 사티바(*Nigella sativa*)는 Ayurvedic, Siddha 및 Unani 의학 시스템에 이의 다수의 치료학적 특성에 대해 익히 공지되어 있다. 상기 식물은 티모퀴논, 티모하이드로퀴논, 디티모퀴논, p-시멘, 카르바크롤, 4-테르피네올, t-아네톨, 세스퀴테르펜 롱기폴렌, α -피넨, 티몰, α -헤데린 및 헤테라게닌과 같은 다수의 활성 분자를 함유하는 것으로 보고되어 있고(Ahmad et al., A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb, Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(5): 337-352), 이들은 식물의 이로운 효과에 관여한다. *니겔라 사티바*의 치료학적 효과들 중 몇몇은 이하 종래 기술분야 문헌에 열거되어 있다:
- [0016] 1. Alimohammadi et al., Protective and antidiabetic effects of extract from *Nigella sativa* on blood glucose concentrations against streptozotocin (STZ)-induced diabetic in rats: an experimental study with histopathological evaluation, Diagn Pathol. 2013; 8: 137.
- [0017] 2. Sultana et al., *Nigella sativa*: Monograph, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2015; 4(4): 103-106.
- [0018] 3. Randhwa and Alghamdi, Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) - a review, Am J Chin Med. 2011;39(6):1075-91.
- [0019] 4. Mahmood et al., *Nigella Sativa* as an Antiglycating Agent for Human Serum Albumin, International Journal of Scientific research, 2013;2(4):25-27
- [0020] 5. Sobhi et al., Effect of lipid extracts of *Nigella sativa* L. seeds on the liver ATP reduction and alpha-glucosidase inhibition, Pak J Pharm Sci., 2016;29(1):111-117.
- [0021] 6. Awasthi S, Understanding the mechanism of antidiabetic activity and efficacy of functional foods against advanced glycation end products: *Nigella sativa* and *Moringa oleifera*, Planta Med, 2013; 79 - PN8
- [0022] 니겔라 사티바의 보고되어 있는 생물학적 효과의 대부분은 전체 추출물에 대한 것이거나 또는 특히 티모퀴논 (thymoquinone)에 대한 것이다. 티모하이드로퀴논(thymohydroquinone)의 생물학적 효과에 대한 보고, 특히 고혈당증의 관리에 관한 보고는 입수불가능하다. 티모하이드로퀴논은 티모퀴논의 환원된 형태이지만 구조적으로 그리고 기능적으로 상이하다. 따라서, 본 발명은 고혈당증 및 관련 장애의 관리를 위해 티모하이드로퀴논이 풍부한 신규하고 뻘하지 않은 조성물을 개시한다.
- [0023] 본 발명의 주된 목적은 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물을 사용하여 α -글루코시다제의 활성을 억제하는 방법을 개시하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 다른 목적은 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물을 투여함으로써 포유동물 세포에 의한 포도당 포착을 증가시키는 방법을 개시하는 것이다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 목적은 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물을 이용한 포유동물에서의 고혈당증 및 관련 장애의 치료학적 관리 방법을 개시하는 것이다.
- [0026] 본 발명은 상기 언급된 목적들을 해소하고 추가로 관련 이점들을 제공한다.
- 발명의 내용**
- [0027] **본 발명의 요약**
- [0028] 본 발명은 티모하이드로퀴논을 포함하는 신규한 조성물을 개시한다. 구체적으로, 본 발명은 효소 α -글루코시

다제의 활성을 억제하기 위한 티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물을 개시한다. 본 발명은 또한 포유동물 세포에 의한 포도당의 세포 포착을 증가시키기 위한 티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물의 용도를 개시한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물을 이용한 포유동물에서의 고혈당증의 치료학적 관리 방법을 개시한다. 또한, 티모하이드로퀴논의 항-산화, 항-염증 및 항-당화 효과도 본원에 개시된다.

[0029] 본 발명의 다른 특징들 및 이점들은 예로서 본 발명의 원리를 예시하는 첨부 도면과 함께 고려하여 하기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] **도 1a 및 도 1b**는 티모퀴논(TQ), 티모하이드로퀴논(THQ) 및 티모하이드로퀴논 조성물의 α-글루코시다제 억제 활성의 그래프 표현을 보여준다.

도 2는 티모퀴논(TQ), 티모하이드로퀴논(THQ) 및 티모하이드로퀴논 조성물로 치료된 지방세포 및 근세포에 의한 포도당 포착률(%)을 보여주는 그래프 표현이다.

도 3은 인슐린(**도 3a**), 티모퀴논(TQ)(**도 3b**), 티모하이드로퀴논(THQ)(**도 3c**) 및 티모하이드로퀴논 조성물(**도 3d**)로 치료된 포유동물 세포에 의한 포도당 포착의 대표적 히스토그램을 보여준다. 치료되지 않은 세포는 대조군 그룹의 역할을 한다(**도 3e**).

도 4는 티모퀴논(TQ)(**도 4a**), 티모하이드로퀴논(THQ)(**도 4b**) 및 티모하이드로퀴논 조성물(**도 4c**)의 DPPH 포착 활성의 그래프 표현을 보여준다.

도 5는 티모하이드로퀴논의 백분율이 증가함에 따른 DPPH 포착 활성 및 글루코시다제 억제 활성 조성물의 그래프 표현을 보여준다. 티모하이드로퀴논 함량의 증가는 생물학적 활성의 증가와 직접적으로 상호관련되어 있었다.

도 6은 티모퀴논의 백분율이 증가함에 따른 DPPH 포착 활성 및 글루코시다제 억제 활성 조성물의 그래프 표현을 보여준다. 티모퀴논 함량의 증가는 생물학적 활성의 증가와 역으로 상호관련되어 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 한 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 글루코시다제 효소의 억제 방법으로서, 상기 방법은:

[0032] i) 글루코시다제 효소를 파라니트로페닐-α-d-글루코피라노사이드 기질(paranitrophenyl-α-d-glucopyranoside substrate)과 접촉시키는 단계;

[0033] ii) 최적 조건 하에서 유효 용량의 티모하이드로퀴논(thymohydroquinone) 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물과 인큐베이션(incubation)하는 단계;

[0034] iii) 분광광도법 및 형광측정법을 이용하여 흡광도의 변화를 판독하는 단계;

[0035] iv) 상기 흡광도를 대조군 블랭크(blank)와 비교하고, 하기 식:

[0036]
$$\text{억제율}(\%) = [(\text{대조군의 흡광도} - \text{억제제의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

[0037] 을 이용하여 티모하이드로퀴논 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물에 의한 효소 억제율(IC₅₀)을 측정하는 단계를 포함하는, 글루코시다제 효소의 억제 방법을 개시한다.

[0038] 한 관련 실시형태에서, 상기 조성물은 약 0.1% 내지 5% w/w의 티모퀴논(thymoquinone), 약 0.01% 내지 10% w/w의 티모하이드로퀴논, 약 20% 내지 95% w/w의 지방산, 약 0.001% 내지 3% w/w의 α-헤데린(α-hederin) 또는 헤데라게닌(hederagenin), 0.1% 내지 4.0% w/w의 안정화제 및 0.2% 내지 2% w/w의 생체이용률 증강제(bioavailability enhancer)를 포함한다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 안정화제는 로즈마린산, 부틸화된 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole), 부틸화된 하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene), 메타중아황산 나트륨(sodium metabisulfite), 갈산 프로필(propyl gallate), 시스테인(cysteine), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 토코페롤(tocopherols)을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 관련 실시형태에서, 상기 생체이용률 증강제는 피페린(piperine), 퀘르세틴(quercetin), 마늘 추출물, 생강 추출물 및 나린진(naringin)을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

[0039] 다른 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 포유동물 세포에 의한 포도당 포착을 증가시키는 방법으로서, 상

기 방법은 포유동물 세포에 의한 포도당 포착을 증가시키기 위해 상기 포유동물 세포를 유효 용량의 티모하이드로퀴논 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 포유동물 세포에 의한 포도당 포착을 증가시키는 방법을 개시한다. 한 관련 실시형태에서, 상기 조성물은 약 0.1% 내지 5% w/w의 티모퀴논, 약 0.01% 내지 10% w/w의 티모하이드로퀴논, 약 20% 내지 95% w/w의 지방산, 약 0.001% 내지 3% w/w의 α -헤데린 또는 헤데라게닌, 0.1% 내지 4.0% w/w의 안정화제 및 0.2% 내지 2% w/w의 생체이용률 증강제를 포함한다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 안정화제는 로즈마린산, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 메타중아황산 나트륨, 갈산 프로필, 시스테인, 아스코르브산 및 토코페롤을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 관련 실시형태에서, 상기 생체이용률 증강제는 피페린, 퀘르세틴, 마늘 추출물, 생강 추출물 및 나린진을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 포유동물 세포는 사람 세포이다.

[0040] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 포유동물에서의 고혈당증 및 관련 병태의 치료학적 관리 방법으로서, 상기 방법은, 유효 용량의 티모하이드로퀴논 또는 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하여 혈중 포도당 수준의 감소를 초래하는 것인, 포유동물에서의 고혈당증 및 관련 병태의 치료학적 관리 방법을 개시한다. 한 관련 실시형태에서, 상기 고혈당증 및 관련 병태의 관리가 글루코시다제 효소를 억제하고, 포도당의 세포 포착을 증가시키고, 유리 라디칼을 감소시키고, 염증을 감소시키고, 당화를 감소시킴으로써 포도당의 흡수를 감소시킴에 의해 초래된다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 고혈당증 관련 병태는 당뇨병, 비만, 고지방단백혈증, 고지혈증, 심혈관 합병증, 암, 죽상 동맥경화증, 신경퇴행성 질환, 알레르기, 염증 및 골다공증을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 질환 상태 내에 존재한다. 한 관련 실시형태에서, 상기 조성물은 약 0.1% 내지 5% w/w의 티모퀴논, 약 0.01% 내지 10% w/w의 티모하이드로퀴논, 약 20% 내지 95% w/w의 지방산, 약 0.001% 내지 3% w/w의 α -헤데린 또는 헤데라게닌, 0.1% 내지 4.0% w/w의 안정화제 및 0.2% 내지 2% w/w의 생체이용률 증강제를 포함한다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 안정화제는 로즈마린산, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 메타중아황산 나트륨, 갈산 프로필, 시스테인, 아스코르브산 및 토코페롤을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 관련 실시형태에서, 상기 생체이용률 증강제는 피페린, 퀘르세틴, 마늘 추출물, 생강 추출물 및 나린진을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 포유동물 세포는 사람 세포이다. 다른 관련 실시형태에서, 상기 조성물은 약제학적으로/영양보조적으로 (nutraceutically) 허용되는 부형제, 보조제(adjuvants), 희석제 또는 담체와 함께 제형화되어 정제, 캡슐, 연질 겔(soft gels), 시럽, 구미(gummies), 분말, 현탁액, 유제(emulsions), 씹어블제(chewables), 캔디(candies) 또는 이터블(eatables)의 형태로 경구 투여된다.

[0041] 본 발명의 기술적 특징 및 기술적 효과를 포함하는 상술의 가장 바람직한 실시형태들은 이하의 예시적 실시예들을 통해 설명된다.

[0042] **실시예 1: 글루코시다제의 억제**

[0043] 글루코시다제 억제를 위해, α -글루코시다제(Code G5003; Sigma-Aldrich, 세인트 루이스, 미주리, 미국)를 0.2% 소 혈청 알부민(Sigma-Aldrich) 및 0.02% 아지드화 나트륨(Sigma-Aldrich)을 함유하는 67mM의 인산 칼륨 완충액, pH 6.8에 용해시켰고, 이를 효소 공급원으로서 사용하였다. 파라니트로페닐- α -D-글루코피라노사이드(Sigma-Aldrich)를 기질로서 사용하였다. 티모퀴논, 티모하이드로퀴논 및 티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물을 칭량하여 63, 125, 250 및 500 μ g/ml의 농도로 제조하였고, 동일한 용적의 증류수로 구성되었다. 50 μ l의 상기 조성물을 50 μ l의 효소 공급원(0.15U/ml)과 함께 5분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 50 μ l의 기질(1.25mM)을 부가하였고, 추가로 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 기질 부가 전 및 기질 부가 후, 마이크로플레이트 판독기(BMG FLUOstar OPTIMA Microplate Reader) 상에서 405nm에서의 흡광도를 측정하였다. 기질 부가시 흡광도의 증가를 측정하였다. 각각의 시험을 3회 수행하였고, 평균 흡광도를 사용하여 α -글루코시다제 억제율(%)을 산출하였다. 각종 농도로의 아카보즈(Acarbose)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 각종 농도의 상기 조성물의 억제 활성을 100 - 음성 대조군(즉, 시험 용액으로서 사용된 물)의 흡광도 변화에 대한 상기 조성물의 흡광도 차이(%)로서 표현하였다. 상기 측정은 삼중으로 수행하였고, IC₅₀ 값(즉, 최대 활성의 50% 억제를 초래하는 상기 조성물의 농도)을 측정하였다.

[0044] 티모하이드로퀴논(IC₅₀ 71.9 μ g/ml) 및 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물(IC₅₀ 150.9 μ g/ml)은 티모퀴논(IC₅₀ 407.6 μ g/ml)과 비교하는 경우 α -글루코시다제의 효과적인 억제를 나타냈다(도 1a 및 도 1b).

[0045] **실시예 2: 포도당 포착의 증가**

[0046] 골격근 세포주 C2C12 근원세포(ATCC로부터 입수)를 10%의 소 태아 혈청이 보충된 DMEM 내에서 5% CO₂로 37℃에서 유지하였다. 24웰 플레이트에 웰(well)당 20,000개의 세포를 씨딩(seeding)하였다. 상기 세포들이 80 내지 90% 컨플루언스(confluence)에 도달했을 때, 성장 배지를 1% 말 혈청을 함유하는 DMEM으로 대체함으로써 분화(differentiation)를 유도하였다. 분화 배지에서 4 내지 5일 후 완전 분화된 C2C12 근원세포에서 실험을 수행하였다. 이어서, 세포들을 저 포도당 배지에서 0.5% BSA로 16시간 동안 처리하였고, 포도당이 없는 차가운 크렙스-링거(Krebs-Ringer) 포스페이트 완충액으로 세척하였다. 이어서, 세포들을 37℃에서 30분 동안 0.1 μM 농도로 인슐린을 갖거나 또는 갖지 않는 저 포도당 DMEM 배지에서 상이한 비 세포독성 농도의 샘플들로 처리하였다. 이어서, 세포들을 차가운 PBS로 세척하였고, 어두운 곳에서 15분 동안 5 μM의 형광성 D-포도당 유사체 2-[N-(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노]-2-테옥시-D-글루코스(2-NBDG)로 염색시켰고, 상기 세포에 의해 생성된 형광성의 유세포측정 검출이 이어졌다.

[0047] 티모하이드로퀴논 및 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물은 티모퀴논과 비교시 지방세포 및 근육 세포에서 증강된 포도당 포착을 나타내었다(도 2a 및 도 2b).

[0048] **실시예 3: 티모하이드로퀴논의 항-산화 활성**

[0049] 티모하이드로퀴논의 항산화 특성은 DPPH 소거(scavenging) 활성에 의해 평가하였다.

[0050] 혈중 당(sugar) 수준의 만성적 증가는 활성 산소종(reactive oxygen species)의 형성을 유발한다. 초산화물(superoxide), 하이드록실, 퍼옥실 및 알콕시 라디칼을 포함하는 활성 산소종(ROS)은 세포 항산화물에 의해 소거되어 평형을 유지한다. 이들 ROS 유도된 손상은 피부 자극, 염증, 노화, 암 및 다수의 기타 질환들을 야기한다. α, α-디페닐-β-피크릴하이드라질(DPPH) 유리 라디칼 소거법이 화합물의 항산화 잠재력을 평가하기 위한 우선적 접근법 중 하나이다.

[0051] 절차

[0052] DPPH는 520nm에서 흡광도를 갖는 메탄올 용액에서 안정한 유리 라디칼이다. 상기 유리 라디칼이 항산화 분자에 의해 소거되는 경우, 얻어진 용액은 황색을 나타낸다. 세포의 대사물질의 수소 원자 또는 전자 공여 능력은 자색의 DPPH 메탄올 용액의 표백에 의해 측정하였다.

[0053] 티모퀴논, 티모하이드로퀴논 및 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물은 각종 농도로 제조하였다. 상기 DPPH 라디칼 소거 검정을 위해, 이전에 기술된 바와 같은 방법(Clarke et al., 2013)에 따라 20 μL의 시험 재료를 96웰 플레이트에서 메탄올 중의 180 μL의 DPPH와 혼합하였다. 상기 플레이트를 15분 동안 어두운 곳에 두었고, 그 후 마이크로플레이트 판독기(TECAN Ltd, 멘네도르프, 스위스)를 이용하여 540nm에서 상기 용액의 흡광도를 측정하였다. 블랭크(DMSO, 메탄올) 및 표준(DMSO 중의 트롤록스(Trolox) 용액)을 동시에 기록하였다. 추출물을 가변 농도로 스크리닝하여 억제 농도(IC₅₀, DPPH 흡광도를 50%까지 감소시키는 농도)를 규명하였다.

[0054] 유리 라디칼 소거 활성은 하기와 같이 산출하였다.

$$(B-C) - (S-C)$$

$$\text{소거 활성률(\%)} = \frac{\text{-----}}{\text{-----}} \times 100$$

$$(B-C)$$

[0055]

[0056] 상기 식에서,

[0057] B = 참조 용액의 흡광도(DPPH의 OD)

[0058] C = 참조 용액 블랭크의 흡광도(메탄올만의 OD)

[0059] S = 시험 용액의 흡광도

[0060] C = 시험 용액 블랭크의 흡광도

[0061] 티모하이드로퀴논은 IC₅₀이 1.78 μg/ml인 강력한 항산화물이다(도 4b). 또한, 상기 티모하이드로퀴논을 포함하는

조성물은 IC₅₀이 540.1 μ g/ml인 우수한 항산화 잠재력을 나타냈고(도 4c), 이는 티모퀴논(도 4a)보다 훨씬 더 효과적이다.

[0062] 실시예 4: 티모하이드로퀴논의 항-염증 활성

[0063] 만성 고혈당증은 TNF- α 와 같은 전-염증성 사이토카인의 생산을 증가시킴으로써 세포 염증을 증가시킨다. 티모퀴논, 티모하이드로퀴논 및 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물을 이들의 TNF- α 억제 활성을 평가함으로써 이들의 항-염증 활성에 대해 시험하였다.

[0064] 세포: 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC: American Type Culture Collection, 매너서스, 버지니아)으로부터 구매하여, 습윤화된(humidified) 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 10%(v/v) 가열-활성화된 소 태아 혈청(FBS; GIBCO/Invitrogen, 칼즈배드, 캘리포니아), 100유닛(units)/mL의 페니실린 및 100 μ g/mL의 스트렙토마이신(Life technologies)이 보충된 로즈웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI: Roswell park memorial institute, Life technologies, 캘리포니아, 미국)에 단층 배양물로서 유지한 THP1- 사람 단핵구.

[0065] 시약 및 완충액: 리포폴리사카라이드(LPS, Sigma chemicals, 미국), 포스페이트 완충된 염수, RPMI, FBS

[0066] ELISA 키트(kit): 사람 TNF ELISA 키트, Krishgen Biosciences, 미국

[0067] 절차

[0068] 항염증 활성은 전염증성 사이토카인을 분비함으로써 리포폴리사카라이드(LPS)에 대해 반응하는 사람 단핵구/대식세포 세포주 THP-단핵구를 이용하여 조사하였다. 종양 괴사 인자(TNF- α)는 염증 반응의 캐스케이드를 촉발시키는 주요 사이토카인 중 하나이다. TNF- α 의 농도는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA: Enzyme linked Immunosorbent assay)을 이용하여 측정하였다. TNF- α 농도의 감소는 상기 화합물의 항 염증 활성을 나타낸다.

[0069] 1×10^5 개의 THP-1 세포를 100ng의 리포폴리사카라이드(LPS, 0.1 μ g/mL)로 자극하여 TNF- α 분비를 유도하였다. LPS 처리 전에 세포를 상이한 농도의 시험 재료(티모퀴논, 티모하이드로퀴논 및 티모하이드로퀴논을 포함하는 조성물)로 전처리하였다. 처리 24시간 후에 상기 세포 상청액(supernatant)을 수집하였고, 제조업자에 의해 기술된 바와 같이 사이토카인 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 TNF- α 가 분비되었다. 자극되지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 검출 한계는 <1pg/mL였다.

[0070] 결과

[0071] 본 결과는 상기 티모하이드로퀴논이 TNF- α 를 억제하였음을 나타냈고(표 1), 이는 세포 생존력에 영향을 미치지 않으면서 유의한 항 염증 활성을 나타낸다.

표 1

티모하이드로퀴논의 항-염증 활성

	농도 (µg/mL)	억제율(%)
티모퀴논	0.13	35
	0.06	31
	0.03	22
티모하이드로퀴논	0.13	11.9
	0.06	4.5
	0.03	2.5
티모하이드로퀴논 조성물	25	26.2
	12.5	19.8
	6.25	14.9

[0072]

[0073]

실시예 5: 티모하이드로퀴논의 항-당화 활성

[0074]

최종 당화 산물(AGE)은 마이야르(Maillard) 반응으로서도 공지되어 있는, 단백질의 아미노 그룹들(주로 라이신 및 아르기닌)과 환원 당의 카르보닐 그룹 사이의 비효소적 부가물 형성에 의해 생성되었다. 초기 단계들에서, 환원당은 유리 아미노 그룹과 반응하여 불안정한 알디민 화합물을 형성하고, 이는 분자를 재배열하여 아마도리 생성물로서 알려져 있는 안정한 초기 당화 생성물을 형성한다. 후기 단계에서, 산화, 탈수 및 환화(cyclization) 반응을 통한 당화 프로세스는 AGE로서도 알려져 있는 최종 당화 산물을 형성한다. Nε-(카르복시메틸)라이신(CML), 피랄린, 펜토시딘과 같은 각종 구조의 AGE들은 노화, 당뇨병, 죽상 동맥경화증, 알츠하이머병, 및 신 부전을 포함하는 퇴행성 장애와 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0075]

펜토시딘은 당뇨병 환자에서 축적되는 것으로 알려져 있고, 베스페르라이신은 백내장 발생 및 당뇨병성 망막병증에서 발견된다. 당화를 예방할 수 있는 제제(agent)는 고혈당증과 관련된 2차 합병증에 대응하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 티모퀴논 및 티모하이드로퀴논을 이들의 항-당화 효과에 대해 시험하였다.

[0076]

AGE는 본질적으로 형광성일뿐만 아니라 비형광성일 수 있다. 전형적으로, 베스페르라이신 유형의 AGE는 370nm에서 여기되고 440nm에서 방출되며, 한편 펜토시딘 유사 AGE는 335nm에서 여기되고 385nm에서 방출된다. 상기 원리는 리보스 당과 소 혈청 알부민이 특정 비율로 혼합되어 24시간 동안 인큐베이션된다는 사실에 근거한다. 상기 반응에 의해 형성된 베스페르라이신 유사 AGE는 390/460nm에서 여기/방출된(Ex/Em) 형광성의 증가에 의해 평가하였고 펜토시딘은 320/405nm에서 여기/방출이 검출되었다.

[0077]

재료

[0078]

리보스, 소 혈청 알부민, 96웰 흑색 미세적정 플레이트

[0079]

리보스 - BSA 방법: 각종 농도의 샘플 10 µl를 40 µl의 BSA(소 혈청 알부민, 25mg/ml 스톡(stock))에 부가하였고, 흑색 96-웰 마이크로플레이트의 웰당 50 µl의 D-리보스(150mg/ml 스톡)를 부가하였고, 37°C에서 24h 동안 인큐베이션하였다. BSA를 대조군으로서 취하였다. 상기 형성된 AGE(최종 당화 산물)은 베스페르라이신의 경우 390/460nm에서의 여기/방출 그리고 펜토시딘 AGE의 경우 320/405nm에서의 여기/방출시 형광성에 의해 검출되었다.

[0080]

결과

[0081] 티모퀴논 및 티모하이드로퀴논에 의한 AGE 베스페르라이신 및 펜토시딘의 억제는 표 2에 표로 작성되어 있다.

표 2

티모하이드로퀴논에 의한 AGE 들의 억제율(%)

농도 (µg/mL)	베스페르라이신의 억제율(%) 390/460nm 에서의 Ex/Em		펜토시딘의 억제율(%) 320/405nm 에서의 Ex/Em	
	TQ	THQ	TQ	THQ
250	56.69	60.42	61.80	89.31
125	44.54	52.28	44.57	68.33
62.5	40.81	43.83	0.06	49.55
31.25	38.55	34.06	23.59	28.73
15.63	0	23.03	0	5.39
IC ₅₀	157.80	108.30	142.70	65.89

[0082]

[0083] 상기 결과는 티모하이드로퀴논이 티모퀴논과 비교시 생물학적으로 보다 강력한 분자이고 증강된 생물학적 활성을 나타냄을 나타냈다.

[0084] 또한, 증가하는 백분율의 티모하이드로 퀴논을 가지고 조성물의 생물학적 효과를 평가하였다. 표 3은 티모하이드로퀴논 함량이 증가된 조성물의 목록을 제공한다.

표 3

티모하이드로퀴논을 함유하는 조성물

조성물	TQ (%)	THQ(%)
1	0.643	0.029
2	0.620	0.093
3	0.558	0.120
4	0.450	0.250

[0085]

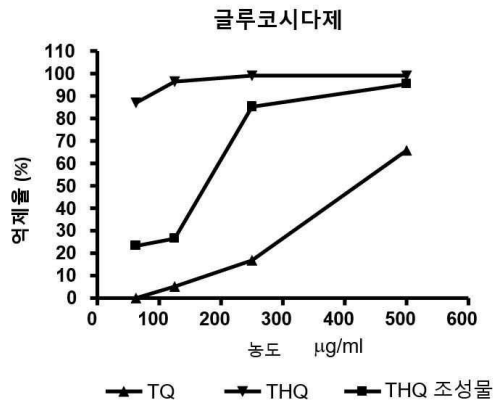
[0086] 상기 조성물들 내의 티모하이드로퀴논 함량의 증가는 티모퀴논과 비교시 보다 높은 DPPH 소거 및 글루코시다제 억제(도 5)와 상호관련되어 있었고, 이는 생물학적 활성과의 상호관계(도 6)를 나타내지는 않았다. 따라서, 티모하이드로퀴논은 고혈당증, 당뇨병, 비만, 고지방단백혈증, 고지혈증, 심혈관 합병증, 암, 죽상 동맥경화증, 신경퇴행성 질환, 알레르기, 염증 및 골다공증을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아닌 각종 질환 및 장애의 효과적인 관리를 위해 제형으로 효과적으로 통합될 수 있다.

[0087] 본 발명에 대한 다른 수정 및 변형은 상술한 개시 및 교시로부터 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명

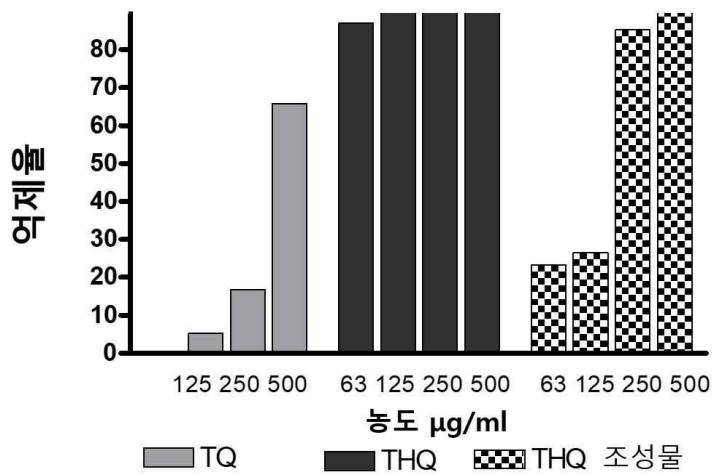
의 소정 실시형태들만이 본원에 구체적으로 기술되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명에 많은 수정이 이루어질 수 있으며 첨부된 청구범위와 함께 해석되어야 한다는 것이 명백할 것이다.

도면

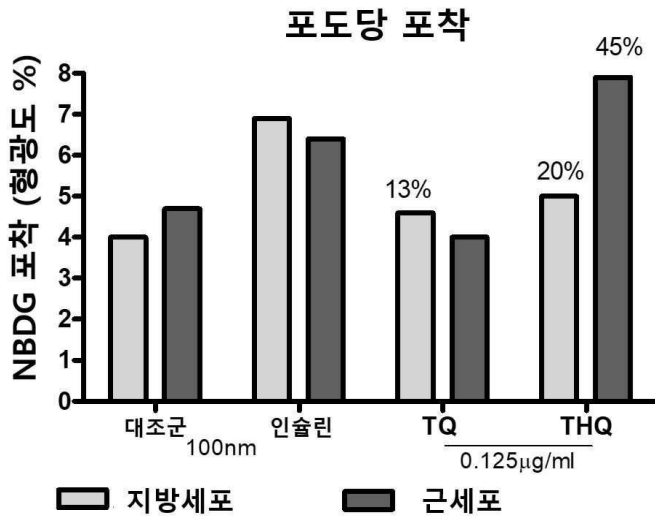
도면1a



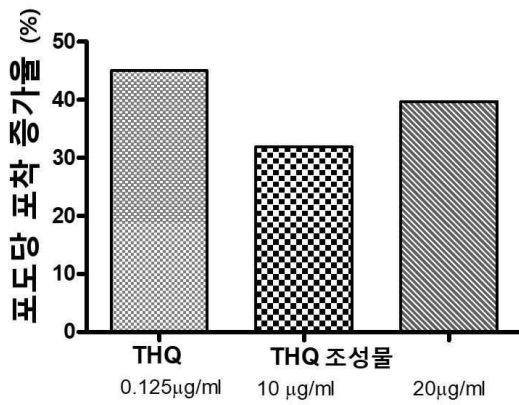
도면1b



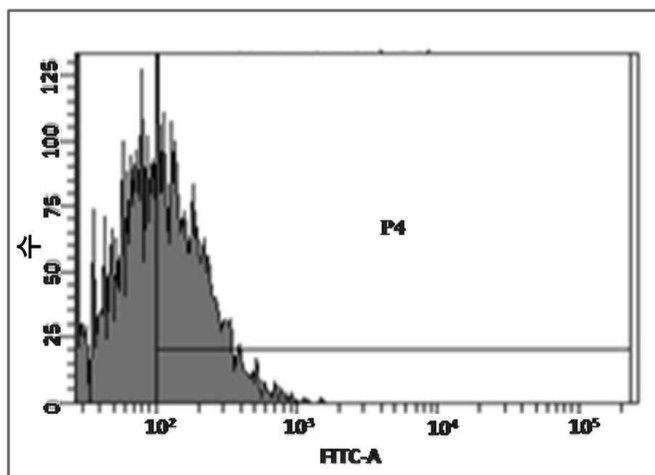
도면2a



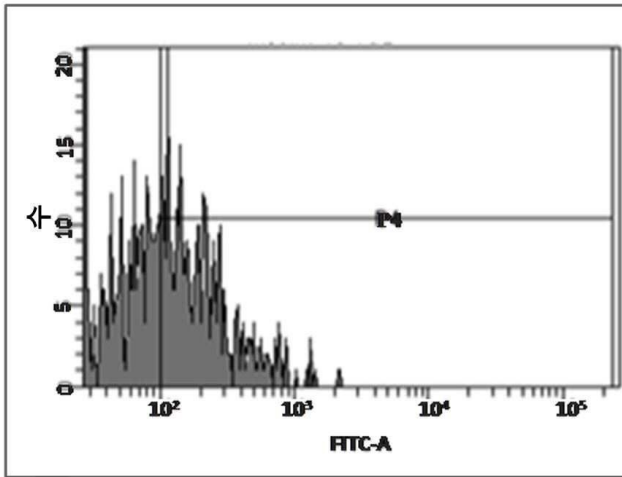
도면2b



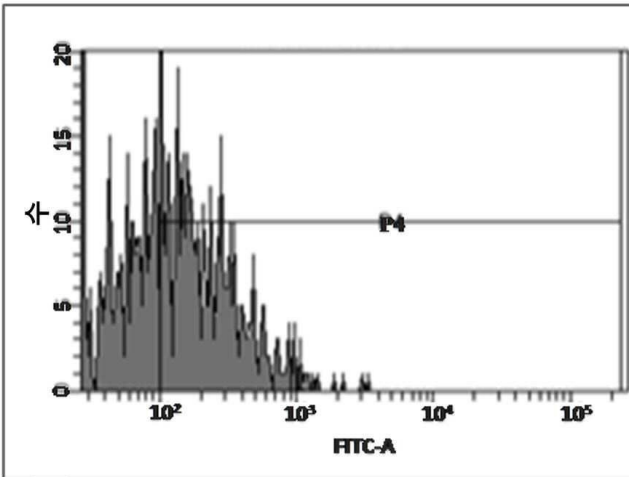
도면3a



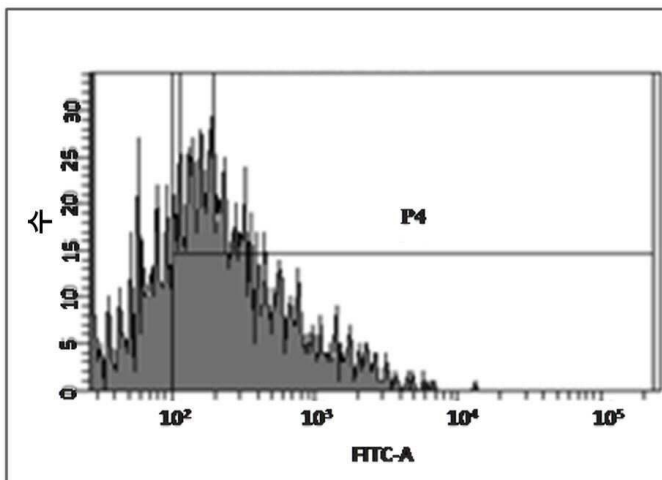
도면3b



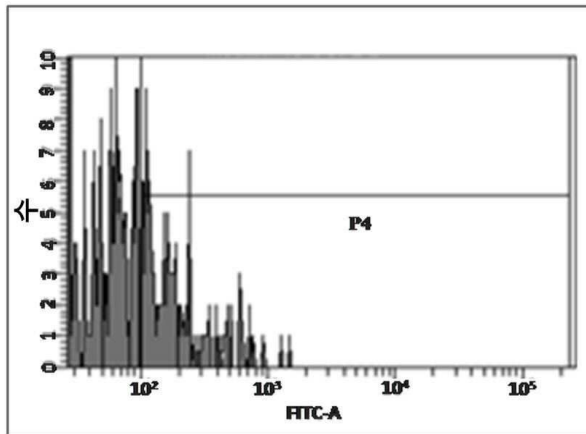
도면3c



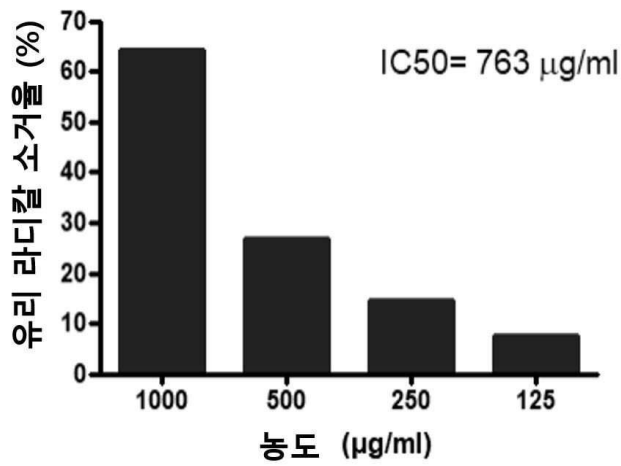
도면3d



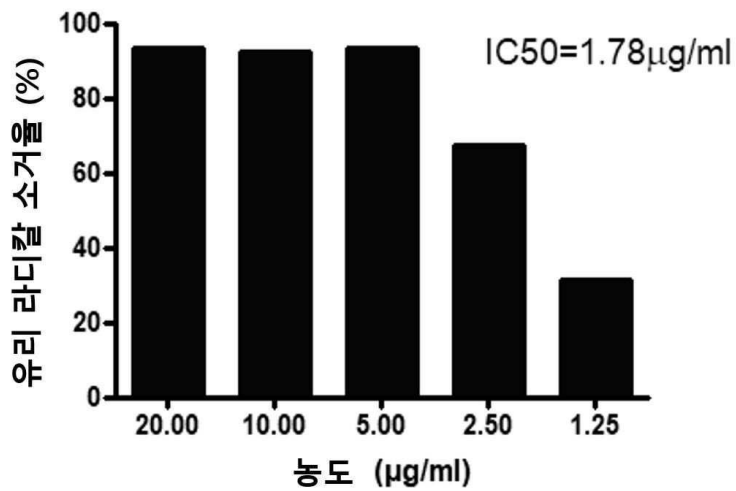
도면3e



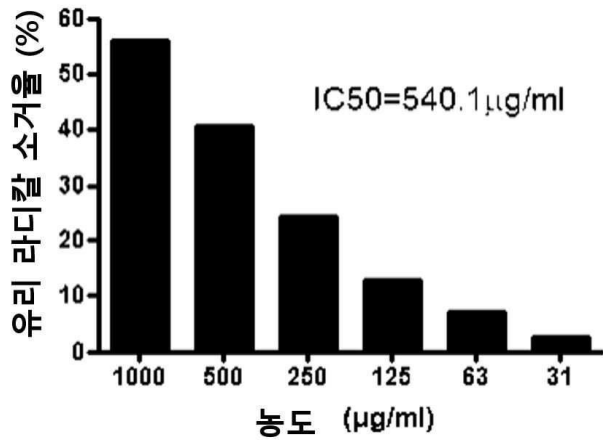
도면4a



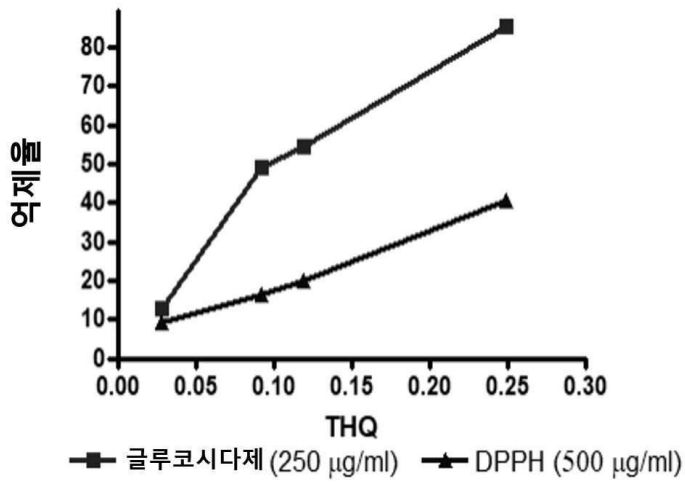
도면4b



도면4c



도면5



도면6

